

511,345

10/511345

10 Read PCT/PTC 15 OCT 2004

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願番号

(19)世界知的所有権機関  
国際事務局(43)国際公開日  
2003年10月23日 (23.10.2003)

PCT

(10)国際公開番号  
WO 03/087358 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C12N 15/01, C12P 23/00 (74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI,Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都 港区 虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル 3F Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/04398
- (22) 国際出願日: 2003年4月7日 (07.04.2003) (81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2002-112240 2002年4月15日 (15.04.2002) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 新日本石油株式会社 (NIPPON OIL CORPORATION) [JP/JP]; 〒105-8412 東京都 港区 西新橋一丁目 3番 12号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 平澤 和明 (HIRASAWA,Kazuaki) [JP/JP]; 〒231-0815 神奈川県横浜市中区千鳥町8番地 新日本石油株式会社内 Kanagawa (JP). 坪倉 章 (TSUBOKURA,Akira) [JP/JP]; 〒231-0815 神奈川県横浜市中区千鳥町8番地 新日本石油株式会社内 Kanagawa (JP). 水田 美能 (MIZUTA,Haruyoshi) [JP/JP]; 〒231-0815 神奈川県横浜市中区千鳥町8番地 新日本石油株式会社内 Kanagawa (JP).

- (84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING CANTHAXANTHIN

(54)発明の名称: カンタキサンチンの製造方法

WO 03/087358 A1

(57) Abstract: A process for producing canthaxanthin characterized by comprising mutagenizing an astaxanthin-producing microorganism the base sequence of DNA corresponding to 16S ribosomal RNA of which is substantially homologous with the base sequence represented by SEQ ID NO:1, selecting a mutant showing a ratio (% by mass) of the thus produced canthaxanthin to the total carotenoid yield higher than that of the parent strain, culturing the obtained canthaxanthin-producing strain and collecting canthaxanthin or a carotenoid mixture containing canthaxanthin from the culture medium thus obtained.

(57) 要約: 16SリボソームRNAに対応するDNAの塩基配列が配列番号1に記載の塩基配列と実質的に相同であるアスタキサンチン生産微生物に突然変異を誘発し、生産されるカンタキサンチンの総カロテノイド生産量に対する比率(質量%)が親株のそれよりも高い変異株を選抜してカンタキサンチン生産微生物を取得し、前記カンタキサンチン生産微生物を培養することにより得た培養物からカンタキサンチン又はカンタキサンチンを含有するカロテノイド混合物を採取することを特徴とするカンタキサンチンの製造方法。

## 明細書

### カンタキサンチンの製造方法

#### 技術分野

本発明は、天然赤色色素としての飼料添加物及び食品添加物等に有用な、カンタキサンチン又はカンタキサンチンを含有するカロテノイド混合物の微生物的製造法に関する。

#### 背景技術

ニワトリなどの家禽類の卵黄、肉、表皮の色調を改善する方法としてカンタキサンチンを飼料に添加することが世界で広く行われている。またカンタキサンチンは、サケ、マス、マダイ、エビなどの魚介類の肉、表皮の色調改善などを目的とした飼料分野、食品、飲料の着色剤としての食品分野での用途がある。

カンタキサンチンは、ある種のキノコ (*Botanical Gazette*, 112, 228-232, 1950)、魚類および甲殻類などに存在していることが知られている。また微生物が生産する例としてはブレビバクテリウム属に属する微生物 (*Applied and Environmental Microbiology*, 55 (10), 2505, 1989)、ロドコッカス属に属する微生物 (特開平2-138996)、コリネバクテリウム属に属する微生物 (特開平6-343482)、新属の細菌E-396株 (特開平2001-95500) が知られている。化学合成法では $\beta$ -カロテンの酸化による方法 (J. Amer. Chem. Soc., 78, 1427, 1956) 及び3-オキソ-C15ホスホニウム塩から合成する方法 (Pure Appl. Chem., 51, 875, 1979) が知られている。

#### 発明の開示

しかしながら、前述のカンタキサンチン化学合成法は有機溶剤を使用するので安全性及び近年の天然物指向の面で問題がある。また従来の微生物による培養で

は生産性が低い、天然物からの抽出ではコストがかかりすぎるという問題がある。

カロテノイド化合物生産菌として知られるE-396株は既にその安全性が確認され、アスタキサンチンを含有するカロテノイド化合物を高濃度で生産する方法が報告されているものの、生産される総カロテノイド中のカンタキサンチンの比率は低い。

また、カンタキサンチンの代替としてパプリカ植物から抽出されるカプサンチンがニワトリ卵黄の色調改善に用いられることがあるが、熱、光などに極めて不安定であること、パプリカの生育状態が天候に大きく左右されるために工業的安定供給が困難であることなどの欠点を有する。

このため安価で、安定供給可能な、安全性の高いカンタキサンチンの製造方法が求められている。

上記課題を解決するため本発明者等は銳意検討した結果、アスタキサンチンを生産する微生物を変異処理することにより、生産される総カロテノイド量に対するカンタキサンチンの比率が高い微生物が容易に得られることを見出し、本発明を完成させるに至った。

即ち、本発明は、以下の手段を提供する。

(1) 16SリボソームRNAに対応するDNAの塩基配列が配列番号1に記載の塩基配列と実質的に相同であるアスタキサンチン生産微生物に突然変異を誘発し、生産されるカンタキサンチンの総カロテノイド生産量に対する比率（質量%）が親株のそれよりも高い変異株を選抜してカンタキサンチン生産微生物を取得し、前記カンタキサンチン生産微生物を培養することにより得た培養物からカンタキサンチン又はカンタキサンチンを含有するカロテノイド混合物を採取することを特徴とするカンタキサンチンの製造方法。

(2) 前記カンタキサンチン生産微生物により生産されるカンタキサンチンの総カロテノイド生産量に対する比率が40質量%以上であることを特徴とする前記(1)に記載の方法。

(3) 前記カンタキサンチン生産微生物により生産されるβ-クリプトキサンチン、ゼアキサンチン、3-ヒドロキシエキネノン、アステロイデノン、アドニル

ビン、アドニキサンチン及びアスタキサンチンのそれぞれの総カロテノイド生産量に対する比率がいずれも20質量%未満であることを特徴とする前記(1)に記載の方法。

(4) アスタキサンチン生産微生物がE-396株(受託番号FERM BP-4283で、1993年4月27日付(原寄託)で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所:日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(現独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター:日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に寄託されている)およびその変異株、並びにA-581-1株(受託番号FERM BP-4671で、1994年5月20日付(原寄託)で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所:日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(現独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター:日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に寄託されている)およびその変異株から選ばれる前記(1)~(3)のいずれかに記載の方法。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の方法においては変異の親株としてアスタキサンチンを生産する微生物が用いられるが、このような微生物としては、その16SリボソームRNAに対応するDNAの塩基配列が配列番号1に記載の塩基配列と実質的に相同であるアスタキサンチン生産細菌が挙げられる。ここで言う実質的に相同であるとはDNAの塩基配列決定の際のエラー頻度等を考慮し98%以上の相同性であることを意味する。

上記配列と実質的に相同的な配列を有するアスタキサンチン生産微生物としては、具体的には、E-396株(FERM BP-4283)及びA-581-1株(FERM BP-4671)、並びにE-396株又はA-581-1株を変異改良することで得られる各種変異株、さらにこれら2種の近縁種を挙げることができる。配列番号1のDNA塩基配列は、E-396株のリボソームRNAに対応するものであり、また配列番号2のDNA塩基配列は、A-581-1株のリボソームRNAに対応するものである。E-396株とA-581-1株の16SリボソームRNAの塩基配列の相同性は99.4%であり、極めて近縁な株であることが判明した。よって、これらの菌株はカロテノイドを生産する細菌

として一つのグループを形成している。本発明の方法において用いられる変異の親株は、E-396株及びA-581-1株、並びにE-396株又はA-581-1株の変異株、さらにこれらの菌株の近縁種として、16SリボソームRNAに対応するDNA塩基配列が配列番号1に記載の塩基配列と98%以上の相同性を有するアスタキサンチン生産細菌として定義される。

本発明に使用するアスタキサンチン生産微生物として挙げられるE-396株について説明する。この株は、本発明者らが新しく単離したものであり、工業技術院生命工学工業技術研究所（独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター）に1993年4月27日にFERM BP-4283として寄託された。さらに具体的な他の微生物としてはA-581-1株を挙げができる。

この株は、発明者らが新しく単離したものであり、工業技術院生命工学工業技術研究所（独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター）に1994年5月20日にFERM BP-4671として寄託された。

本発明においてアスタキサンチン生産微生物を変異処理する方法は、突然変異を誘発するものであれば特に限定されない。たとえば、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（NTG）、エチルメタンスルホネート（EMS）、などの変異剤による化学的方法、紫外線照射、X線照射などの物理的方法、遺伝子組換え、トランスポゾンなどによる生物学的方法などを用いることができる。この変異処理は1回でもよいし、また、例えばこの突然変異処理によりアスタキサンチン生産微生物の変異体を得て、これをさらに突然変異処理するというように2回以上の変異処理を行ってもよい。

本発明においてアスタキサンチン生産微生物を変異処理して得られた変異株の中から生産するカンタキサンチンの総カロテノイド量に対する比率の特に高い変異株を選抜する方法は、変異株を培養して得られた培養液中のカロテノイド化合物を分析することにより達成される。

この培養方法は、たとえば次のとおりである。すなわち、生産菌の生育に必要で、カロテノイド化合物を生成する成分を含む培地で培養を行う。培養方法は試験管、フラスコなどの振とう培養、通気搅拌培養などいずれの方法でもよい。力

カロテノイド化合物の分析方法は、カロテノイド化合物を分離検出できる方法なら何でも良いが、たとえば、高速液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、ペーパークロマトグラフィーなどを用いることができる。

本発明においてカンタキサンチン生産微生物の取得は、カンタキサンチンの総カロテノイド量に対する比率の高い変異株を選抜することにより行われるが、ここで言う総カロテノイド量とは、アスタキサンチン、カンタキサンチン、アドニキサンチン、 $\beta$ -カロテン、エキネノン、ゼアキサンチン、 $\beta$ -クリプトキサンチン、3-ヒドロキシエキネノン、アステロイデノン、アドニルビン等のカロテノイド化合物の総量を示す。

E-396株のごときアスタキサンチン生産微生物は、アスタキサンチン、カンタキサンチン、アドニキサンチン、 $\beta$ -カロテン、エキネノン、ゼアキサンチン、 $\beta$ -クリプトキサンチン、3-ヒドロキシエキネノン、アステロイデノン、アドニルビン等の多種のカロテノイド化合物を同時に生成するので、カンタキサンチンの総カロテノイド量に対する比率は低く、通常は2%～20%程度である。

本発明においては、アスタキサンチン生産微生物に突然変異を誘発し、生産するカンタキサンチンの総カロテノイド量に対する比率が特に高い変異株を選抜する。その選抜の基準となるカンタキサンチンの比率は、変異前の親株のカンタキサンチン生産比率より高いことが最低限の条件であるが、生産される総カロテノイド量に対してカンタキサンチンを好ましくは40質量%以上、より好ましくは60質量%以上の比率で含むカロテノイドを生産する変異株を選抜する。

アスタキサンチンの生合成は $\beta$ -カロテンを上流とし、ケト化酵素および水酸化酵素によりそれぞれ両端の6員環が修飾されて行われると推定されている。この水酸化酵素が完全に欠損すれば、 $\beta$ -カロテン、エキネノン、カンタキサンチンだけが生産され、水酸化酵素を必要とする $\beta$ -クリプトキサンチン、ゼアキサンチン、3-ヒドロキシエキネノン、アステロイデノン、アドニルビン、アドニキサンチン、3-ヒドロキシエキネノン、アステロイデノン、アドニルビン、アドニキサンチン

及びアスタキサンチンの総カロテノイド量に対する比率が低くなることが推定される。したがって、変異株の中からカンタキサンチン生産微生物を選抜するためのもう一つの有効な手段としては、 $\beta$ -クリプトキサンチン、ゼアキサンチン、3-ヒドロキシエキネノン、アステロイデノン、アドニルビン、アドニキサンチン及びアスタキサンチンの総カロテノイド量に対するそれぞれの比率が低いことを基準に選抜する方法を用いることができる。それぞれの化合物の総カロテノイドに対する比率が、好ましくは20質量%未満、より好ましくは10質量%未満であることを基準に選抜することができる。

本発明においてカンタキサンチン又はカンタキサンチンを含有するカロテノイド混合物を採取するための、カンタキサンチン生産微生物を培養する方法は、カンタキサンチンを生成する条件であればいずれの方法でもよいが、例えば、以下のような方法を採用できる。すなわち、培地としては生産菌が生育に必要な炭素源、窒素源、無機塩および必要であれば特殊な要求物質（例えば、ビタミン、アミノ酸、核酸等）を含むものを使用する。炭素源としてはグルコース、シュークロース、フルクトース、トレハロース、マンノース、マンニトール、マルトース等の糖類、酢酸、フマル酸、クエン酸、プロピオン酸、リンゴ酸、マロン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール、イソブタノール等のアルコール類等が挙げられる。添加割合は炭素源の種類により異なるが、通常培地1L当たり1～100g、好ましくは2～50gである。窒素源としては、例えば、硝酸カリウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、アンモニア、尿素等の1種または2種以上が用いられる。添加割合は窒素源の種類により異なるが、通常培地1Lに対し0.1～20g、好ましくは1～10gである。無機塩としてはリン酸二水素カリウム、リン酸水素二カリウム、リン酸水素二ナトリウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、硫酸鉄、塩化鉄、硫酸マンガン、塩化マンガン、硫酸亜鉛、塩化亜鉛、硫酸銅、塩化カルシウム、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム等の1種又は2種以上が用いられる。添加割合は無機塩の種類により異なるが、通常、培地1Lに対し0.1mg～10gである。特殊な要求物質としてはビタミン類、核酸類、酵母エキス、ペプトン、肉エキス、麦芽エキス、コーンスティード

プリカーパー、乾燥酵母、大豆粕、大豆油、オリーブ油、トウモロコシ油、アマニ油等の1種または2種以上が用いられる。添加割合は特殊な要求物質の種類により異なるが、通常、培地1Lに対し0.01mg～100gである。培地のpHは2～12、好ましくは6～9に調整する。培養条件は10～70℃、好ましくは20～35℃の温度であり、通常1日～20日間、好ましくは2～9日間振とう培養あるいは通気搅拌培養を行う。

次に、以上 の方法により得られた培養液から水分を除去する作業を行う。カンタキサンチン含有物を得るために、培養液からどの程度の水分除去が必要かは培養液の色素含有量等の状態により異なるが、一般にまずろ過の作業を行いさらに水分の除去が必要であれば沈殿物の乾燥を行う。ろ過の方法は、通常のろ過法、遠心分離法などにより行うことができる。さらに沈殿物中のカロテノイド化合物の含有量を上げる必要がある場合には、沈殿物を乾燥して水分を除去する方法をとることが可能である。乾燥の方法としては、通常の噴霧乾燥、ドラム乾燥、凍結乾燥などが挙げられる。

以上 の方法で得られたカンタキサンチンを含む微生物培養沈殿物は飼料添加用色素含有物としてそのまま使用することができる。本発明の方法により得られるカンタキサンチン及びカロテノイド化合物を飼料用等の色素添加剤として用いる場合には、カンタキサンチン及びカロテノイド化合物の分解を防止する目的でブチルハイドロキシトルエン、エトキシキン、ビタミンEなどの酸化防止剤を添加することも可能である。さらにこれらの表面をゼラチンなどで被覆しても良い。

本明細書は本願の優先権の基礎である特願2002-112240号の明細書に記載される内容を包含する。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

##### [実施例1]

E-396株 (FERM BP-4283: カンタキサンチン生産比率 7.

4質量%）を濃度150mg/LのNTG（N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン）で、温度28℃、30分間静置して変異処理を行った。表1の組成からなる培地6mlを内径18mmの試験管に入れ121℃、15分間蒸気殺菌し、試験管培地を作製した。コロニーアイソレーションした変異株400株をそれぞれ試験管培地に1白金耳植菌し、28℃で4日間、300rpmの往復振とう培養を行った。次にこの培養物を遠心分離し、得られた菌体のカロテノイド化合物の分析を高速液体クロマトグラフィーにより行ったところ、総カロテノイド生産量に対するカンタキサンチンの比率が60質量%以上を示す菌株を得た。この菌株のカロテノイド化合物の分析結果を表2に示した。

表1

組成	添加量 g/L
酵母エキス	20
ペプトン	5
しょ糖	50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ・12H <sub>2</sub> O	3.8
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.5
FeSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.01
CaCl <sub>2</sub> ・2H <sub>2</sub> O	0.01
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	培地がpH7となる量

表2

カロテノイド化合物	培養液当たり生成濃度 mg/L	生成比率 質量%
β-カロテン	0.3	7.1
エキネノン	0.5	11.9
3-ヒドロキシエキネノン	0.0	0.0
カンタキサンチン	2.7	64.3
アドニルビン	0.6	14.3
β-クリプトキサンチン	0.0	0.0
アスタキサンチン	0.1	2.4
アステロイデノン	0.0	0.0
アドニキサンチン	0.0	0.0
ゼアキサンチン	0.0	0.0

## 〔実施例 2〕

E-396 株 (FERM BP-4283) をNTGで変異処理し、赤色の色調が濃いコロニーを選抜してアスタキサンチンの生産性が向上した変異株Y-1071株 (カンタキサンチン生産比率 6.5 質量%) を取得した。このY-1071株をさらにNTGで変異処理した。前記表1の組成からなる培地6m1を内径1.8mmの試験管に入れ121℃、15分間蒸気殺菌し、試験管培地を作製した。コロニーアイソレーションした変異株1000株をそれぞれ試験管培地に1白金耳植菌し、28℃で4日間、300rpmの往復振とう培養を行った。次にこの培養物を遠心分離し、得られた菌体のカロテノイド化合物の分析を高速液体クロマトグラフィーにより行ったところ、 $\beta$ -クリプトキサンチン、ゼアキサンチン、3-ヒドロキシエキネノン、アステロイデノン、アドニルビン、アドニキサンチンおよびアスタキサンチンの総カロテノイド量に対する比率がいずれも10質量%未満である菌株を2株得た。この2菌株のカロテノイド化合物の分析結果を表3および表4に示した。

表3

カロテノイド化合物	培養液当たり生成濃度 mg/L	生成比率 質量%
$\beta$ -カロテン	0.8	8.1
エキネノン	1.1	11.1
3-ヒドロキシエキネノン	0.0	0.0
カンタキサンチン	7.0	70.7
アドニルビン	0.9	9.1
$\beta$ -クリプトキサンチン	0.0	0.0
アスタキサンチン	0.1	1.0
アステロイデノン	0.0	0.0
アドニキサンチン	0.0	0.0
ゼアキサンチン	0.0	0.0

表4

カロテノイド化合物	培養液当たり生成濃度 mg/L	生成比率 質量%
β-カロテン	0.6	5.5
エキネノン	0.7	6.4
3-ヒドロキシエキネノン	0.0	0.0
カンタキサンチン	9.6	88.1
アドニルビン	0.0	0.0
β-クリプトキサンチン	0.0	0.0
アスタキサンチン	0.0	0.0
アステロイデノン	0.0	0.0
アドニキサンチン	0.0	0.0
ゼアキサンチン	0.0	0.0

## 〔実施例3〕

A-581-1株 (FERM BP-4671 : カンタキサンチン生産比率5.3質量%) にUVランプで紫外線を照射し変異処理を行った。表1の組成からなる培地6mlを内径18mmの試験管に入れ121℃、15分間蒸気殺菌し、試験管培地を作製した。コロニーアイソレーションした変異株300株をそれぞれ試験管培地に1白金耳植菌し、28℃で4日間、300rpmの往復振とう培養を行った。次にこの培養物を遠心分離し、得られた菌体のカロテノイド化合物の分析を高速液体クロマトグラフィーにより行ったところ、総カロテノイド量に対するカンタキサンチンの比率が60質量%以上を示す菌株を1株得た。この菌株のカロテノイド化合物の分析結果を表5に示した。

表5

カロテノイド化合物	培養液当たり生成濃度 mg/L	生成比率 質量%
β-カロテン	0.2	8.7
エキネノン	0.3	13.0
3-ヒドロキシエキネノン	0.0	0.0
カンタキサンチン	1.5	65.2
アドニルビン	0.2	8.7
β-クリプトキサンチン	0.0	0.0
アスタキサンチン	0.1	4.3
アステロイデノン	0.0	0.0
アドニキサンチン	0.0	0.0
ゼアキサンチン	0.0	0.0

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

#### 産業上の利用の可能性

本発明により、安価で、安定供給可能な、安全性の高いカンタキサンチンの製造方法が提供される。

## 請 求 の 範 囲

1. 16SリボソームRNAに対応するDNAの塩基配列が配列番号1に記載の塩基配列と実質的に相同であるアスタキサンチン生産微生物に突然変異を誘発し、生産されるカンタキサンチンの総カロテノイド生産量に対する比率（質量%）が親株のそれよりも高い変異株を選抜してカンタキサンチン生産微生物を取得し、前記カンタキサンチン生産微生物を培養することにより得た培養物からカンタキサンチン又はカンタキサンチンを含有するカロテノイド混合物を採取することを特徴とするカンタキサンチンの製造方法。
2. 前記カンタキサンチン生産微生物により生産されるカンタキサンチンの総カロテノイド生産量に対する比率が40質量%以上であることを特徴とする請求の範囲第1項記載の方法。
3. 前記カンタキサンチン生産微生物により生産されるβ-クリプトキサンチン、ゼアキサンチン、3-ヒドロキシエキネノン、アステロイデノン、アドニルビン、アドニキサンチン及びアスタキサンチンのそれぞれの総カロテノイド生産量に対する比率がいずれも20質量%未満であることを特徴とする請求の範囲第1項記載の方法。
4. アスタキサンチン生産微生物がE-396株(FERM BP-4283)およびその変異株、並びにA-581-1株(FERM BP-4671)およびその変異株から選ばれる請求の範囲第1項～第3項のいずれか1項記載の方法。  
。

## SEQUENCE LISTING

<110> Nippon Oil Corporation

<120> Method for producing canthaxanthin

参考文献

<130> PH-1759PCT

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1452

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Description of Unknown Organism:E-396

<400> 1

agtttgcattcc tggctcagaa cgaacgctgg cggcaggctt aacacatgca agtcgagcga 60  
gaccttcggg tctagcggcg gacgggttag taacgcgtgg gaacgtgccc ttctctacgg 120  
aatagccccg ggaaactggg agtaataccg tatacgccct ttgggggaaa gatttatcgg 180  
agaaggatcg gcccgcggtt gatttaggtag ttggtggtt aatggcccac caagccgacg 240  
atccatagct ggttttagagag gatgatcagc cacactggga ctgagacacg gcccagactc 300

ctacggagg cagcagtggg gaatcttaga caatggggc aaccctgtac tagccatgcc 360  
gcgtgagtga tgaaggcctt agggttgtaa agctctttca gctggaaaga taatgacggt 420  
accagcagaa gaagccccgg ctaactccgt gccagcagcc gcggtaatac ggagggggct 480  
agcgttgttc ggaattactg ggcgtaaagc gcacgttaggc ggactggaaa gtcagagggt 540  
aaatcccagg gctcaacctt ggaactgcct ttgaaaactat cagtctggag ttcgagagag 600  
gtgagtgaa ttccgagtgt agaggtgaaa ttctgttagata ttctggagaa caccagtggc 660  
gaaggcggct cactggctcg atactgacgc tgaggtgcga aagcgtgggg agcaaacagg 720  
attagatacc ctggtagtcc acgccgtaaa cgatgaatgc cagacgtcgg caagcatgct 780  
tgtcgggtgc acacctaacf gattaagcat tccgcctggg gagtacggtc gcaagattaa 840  
aactcaaagg aattgacggg ggcccgaca agcggtgag catgtggtt aattcgaagc 900  
aacgcgcaga accttaccaa cccttgacat ggcaggaccg ctggagagat tcagcttct 960  
cgtaagagac ctgcacacag gtgctgcatt gctgtcgtca gctcggtgc tgagatgttc 1020  
ggtaagtcc ggcaacgagc gcaaccacg tccctagtgt ccagcaattc agttggAAC 1080  
tctatggaaa ctgccgatga taagtctggag gaaggtgtgg atgacgtcaa gtcctcatgg 1140  
gccttacggg ttgggctaca cacgtgtac aatggtggtg acagtgggtt aatccccaaa 1200  
agccatctca gttcgatttgc tcctctgcaa ctgcaggaccg tgaagttggaa atcgcttagta 1260  
atcgcgaaac agcatgccgc ggtgaatacg ttcccggtcc ttgtacacac cgcccggtcac 1320  
accatggag ttggttctac ccgacgacgn tgctgttaacc ttctgggggc aggcggccac 1380  
ggtaggatca gcgactgggg tgaagtcgtt acaaggtagc cgttagggaa cctgcggctg 1440  
gatcacctcc tt 1452

<210> 2

<211> 1426

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> Description of Unknown Organism:A-581-1

&lt;400&gt; 2

tagagtttga tcctggctca gaacgaacgc tggcggcagg cttAACACAT gcaAGTCGAG 60  
cgagaccttc gggtagctcg gcggacgggt gagtaacgcg tggAACGTG ccTTCTCTA 120  
cgGAATAGCC CCGGAAACT gggAGTAATA ccgtatacgc CCTTGGGGG aaAGATTAT 180  
cgGAGAAGGA tcggcccgcg ttggattAGG tagttggtga ggtaacggct caccaAGCCG 240  
acgatccata gctggTTGA gaggatgatc agccacactg ggactgagac acggcccaga 300  
ctcctacggg aggCAGCAGT gggAAATCTT agacaatggg ggcaaccctg atctAGCCAT 360  
GCCGCGTgag tgatGAAGGC cttaggTTG taaAGCTTT tcagCTGGGA agataatgac 420  
ggTACCAGCA gaagaAGCCC CGGCTAACTC cgtGCCAGCA GCCGCGTAA tacggaggGG 480  
gctAGCGTTG ttCGGAATTa ctggcgtaa agcgcacgta ggcggactgg aaagtcaGAG 540  
gtGAAATCCC agggCTCAAC ctggAACTG CCTTGAACAC tatcAGTCtg gagttcgaga 600  
gaggTGAGTG gaattccgag tgtAGAGTG aaattcgtAG atattcggag gaacaccAGT 660  
ggcgaaggcg gctcaCTGGC tcgataCTGA CGTgAGGTG CGAAAGCGTG gggagcaaAC 720  
aggattAGAT accCTGGTAG tccacGCCGT aaacgatgaa tgccAGACGT CGGCAAGCAT 780  
gcttgcgt gtCACACCTA acggattaAG cattCCGCTT gggagtaCG gtcgcaAGAT 840  
taaaACTCAA aggaattGAC gggggcccgc acaAGCGGTG gagcatgtgg tttaattcga 900  
agcaACGCGC agaacCTTAC caaccTTGA catggcAGGA CCgCTGGAGA gattcAGCTT 960  
tctcgtaAGA gacCTGACA caggtgCTGC atggCTGTG tcagCTGTG tcgtgAGATG 1020  
ttcggtaAG tccggcaACG agcgcaACCC acgtCCCTAG ttGCCAGCAT tcagTTGGC 1080  
actCTATGGA aactGCCGT gataAGCCGG aggaAGGTG ggatgacgTC aagtCCCTCAT 1140  
ggCCCTTACG ggttggGCTA cacacgtGCT acaatGGTGG tgacAGTGGG ttaatccccA 1200  
aaAGCCATCT cagttcgGAT tgcCTCTGC aactcgAGGG catgaAGTTG gaatcgCTAG 1260  
taatcgCGGA acagcatGCC gcggTGAATA cgttcccGGG CCTTGTACAC accGCCGTC 1320  
acaccatGGG agttggTTCT acccgacGAC gctgCGCTAA ccTTcGGGG aggCAGGCGG 1380  
ccacGGTAGG atcagcgact ggggtgaAGT cgtaacaagg tagCCA 1426

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
/JP03/04398

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/01, C12P23/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/00-15/90, 1/20, C12P23/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ, BIOSIS/CA/WPIIDS (STN), JSTPlus (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 9-308481 A (Nippon Oil Co., Ltd.), 02 December, 1997 (02.12.97), Page 10, left column, lines 8 to 17; example 4 (Family: none)	1-4
X A	EP 1138208 A1 (NIPPON MITSUBISHI OIL CORP.), 04 October, 2001 (04.10.01), & JP 2001-95500 A & WO 01/22833 A1	1, 4 2, 3
X A	WO 01/96591 A1 (NIPPON MITSUBISHI OIL CORP.), 10 December, 2001 (10.12.01), & EP 1229126 A1 & US 2003/44886 A1 & JP 2001-352995 A	1, 4 2, 3

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search 22 May, 2003 (22.05.03)	Date of mailing of the international search report 03 June, 2003 (03.06.03),
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

/JP03/04398

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/06586 A1 (YISSUM RES DEV CO HEBREW UNIV JERUSALEM), 11 February, 1999 (11.02.99), & EP 1005565 A1 & US 5935808 A & JP 2001-512030 A	1 2-4
A	TSUBOKURA, A. et al., <i>Paracoccus carotinifaciens</i> sp. nov., a new aerobic gram-negative astaxanthine-producing bacterium. <i>Int.J.Syst.Bacteriol.</i> , 1999, 49, pages 277 to 282	1-4
A	EP 872554 A2 (HOFFMANN LA ROCHE & CO AG F), 21 October, 1998 (21.10.98), & JP 10-155497 A	1-4
A	EP 769551 A1 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA), 23 April, 1997 (23.04.97), & WO 96/28545 A1 & JP 8-242861 A	1-4
A	TRINIDAD D.M. et al., Analysis of canthaxanthin and related pigments from <i>Gordonia jacobaea</i> mutants. <i>J.Agric.Food Chem.</i> , 2001, 49, pages 1200 to 1202	1-4
A	NELIS H.J. et al., Reinvestigation of <i>Brevibacterium</i> sp. strain KY-4313 as a source of canthaxanthin. <i>Applied and Environmental Microbiology</i> , 1989, 55(10), pages 2505 to 2510	1-4

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' C12N15/01, C12P23/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' C12N15/00-15/90, 1/20, C12P23/00

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ

BIOSIS/CA/WPIDS(STN)

JSTPlus(JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリーエ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 9-308481 A(日本石油株式会社) 1997. 12. 02; 第10頁左欄8-17行、実施例4 (ファミリーなし)	1-4
A	EP 1138208 A1(NIPPON MITSUBISHI OIL CORP) 2001. 10. 04 &JP 2001-95500 A &WO 01/22833 A1	1, 4 2, 3

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

22. 05. 03

## 国際調査報告の発送日

@3.06.03

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

伏見 邦彦

4 B 9838

印

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	WO 01/96591 A1(NIPPON MITSUBISHI OIL CORP)	1, 4
A	2001. 12. 10	2, 3
	&EP 1229126 A1 &US 2003/44886 A1 &JP 2001-352995 A	
X	WO 99/06586 A1(YISSLUM RES DEV CO HEBREW UNIV JERUSALEM)	1
A	1999. 02. 11	2-4
	&EP 1005565 A1 &US 5935808 A &JP 2001-512030 A	
A	TSUBOKURA A et al., Paracoccus carotinifaciens sp. nov., a new aerobic gram-negative astaxanthine-producing bacterium. Int. J. Syst. Bacteriol. 1999, 49, p. 277-282	1-4
A	EP 872554 A2(HOFFMANN LA ROCHE & CO AG F)	1-4
	1998. 10. 21	
	&JP 10-155497 A	
A	EP 769551 A1(KIRIN BEER KK)	1-4
	1997. 04. 23	
	&WO 96/28545 A1 &JP 8-242861 A	
A	TRINIDAD D M et al., Analysis of canthaxanthin and related pigments from Gordonia jacobaea mutants. J Agric Food Chem, 2001, 49, p. 1200-1202	1-4
A	NELIS H J et al., Reinvestigation of Brevibacterium sp. strain KY-4313 as a source of canthaxanthin. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55(10), p. 2505-2510	1-4